

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Bioteekniikka

2018

Tapio Metz

# PIKORNAVIRUSGENOMIN MONISTUS RT-PCR- MENETELMÄLLÄ

Tapio Metz

## PIKORNAVIRUSGENOMIN MONISTUS RT-PCR-MENETELMÄLLÄ

Työn tarkoituksena oli kehittää ja optimoida menetelmä jolla on mahdollista monistaa kokonainen pikornavirusgenomi hyödyntäen pitkää RT-PCR-menetelmää. Tässä menetelmässä virus-RNA käännetään ensin RT-entsyymien avulla cDNA:ksi, josta PCR-reaktiossa muodostetaan genomin pituinen DNA-juoste. Näytteinä käytettiin plasmidiin kloonattuja virusgenomeja ja virus-RNA:ta.

Työssä oli tarkoitus kokeilla kaupallisesti saatavilla olevien eri valmistajien RT- ja PCR-entsyymejä pitkä-RT-PCR-menetelmässä. Työ oli suunniteltu tehtäväksi siten, että ensin testattiin PCR-entsyymejä ja sitten RT-entsyymejä kehitetyn RT-PCR-menetelmän kanssa. Alustavan analyysin perusteella valittiin parhaat PCR-entsyymit uusiin kokeisiin, joissa testattiin miten syklimäärä ja nukleotidikonsentraatio vaikuttivat reaktioiden toimivuuteen.

Työn aikana todettiin kahden PCR-entsyymien toimivan muita paremmin tutkimukseen valittujen näytteiden kanssa. Kehitetty PCR-menetelmä osoitti toimivuutensa ja sitä voidaan jatkossa käyttää RT-entsyymien testauksessa RT-PCR-reaktiossa, jota ei ehditty viemään loppuun projektin aikana.

### ASIASANAT:

enterovirus, parechovirus, rinovirus, pikornavirus, PCR, polymeerasiketjureaktio, RT-PCR, käänteistranskriptio

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2018 | 27 pages

Tapio Metz

# AMPLIFICATION OF PICORNAVIRUS GENOME BY RT-PCR

The purpose of this study was to develop and optimize a method for complete picornavirus genome amplification by long range RT-PCR. In this method the viral RNA and a RT enzyme are used to synthesize cDNA that forms a whole genome length DNA strand during PCR reaction. Viral genomes cloned into plasmid and viral RNA were used as templates in the reaction.

Several commercially available RT and PCR enzymes from different manufacturers were intended to be tested for their ability to amplify long genomic fragments. The study plan was to first test the PCR enzymes and then the RT enzymes using the developed RT-PCR protocol. Based on preliminary analysis the best performing PCR enzymes were chosen for further tests in which the effect of PCR cycles and nucleotide concentration on the reaction result were tested.

Two of the PCR enzymes possessed superior performance over the rest of the enzymes. A functional long PCR protocol was developed, and it can be utilized in future studies, e.g. to test RT enzymes in RT-PCR reaction, which was not optimized due to time limitations.

## KEYWORDS:

enterovirus, parechovirus, rhinovirus, picornavirus, PCR, polymerase chain reaction, RT-PCR, reverse transcription

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET</b>	<b>7</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 PIKORNAVIRUKSET</b>	<b>9</b>
<b>3 TUTKIMUSMENETELMÄT</b>	<b>11</b>
3.1 Pitkä-PCR	11
3.2 Käänteistranskriptio	12
3.3 Agaroosigeelielektroforeesi	12
<b>4 REAGENSIT</b>	<b>14</b>
4.1 Entsyymit	14
4.2 Alukkeet	15
4.3 Näytteet	15
<b>5 TOTEUTUS</b>	<b>16</b>
5.1 PCR-entsyymit	16
5.1.1 Syklimäärä	17
5.1.2 Nukleotidikonsentraatio	17
5.2 RT-entsyymit	17
<b>6 TULOKSET</b>	<b>19</b>
6.1 PCR-entsyymit	19
6.1.1 Syklimäärä	22
6.1.2 Nukleotidikonsentraatio	24
6.2 RT-entsyymit	24
<b>7 JOHTOPÄÄTÖKSET</b>	<b>25</b>
7.1 Pohdintaa	25
7.2 Jatkotutkimukset	25
<b>LÄHTEET</b>	<b>27</b>

# LIITTEET

Liite 1. Pipetointikaaviot

## KUVAT

Kuva 1. Pikornaviruksen rakenne. (ViralZone 2018)	9
Kuva 2. Pikornaviruksen genomi. (ViralZone 2018)	10
Kuva 3. Polymeraasiketjureaktio. (XXPress PCR 2018)	11
Kuva 4. Käänteistranskriptio. (Thermo Fisher Scientific 2018)	12
Kuva 5. KAPA-polymeraasin tulokset. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$ ja $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.	19
Kuva 6. Phusion-polymeraasin tulokset. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$ ja $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.	20
Kuva 7. PrimeSTAR-polymeraasin tulokset. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$ ja $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.	20
Kuva 8. Universe-polymeraasin tulokset. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$ ja $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.	21
Kuva 9. Q5-polymeraasin tulokset. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$ ja $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.	21
Kuva 10. PrimeSTAR-polymeraasin tulokset, 50 sykliä. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$ ja $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.	22
Kuva 11. PrimeSTAR-polymeraasin tulokset, 60 sykliä. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$ ja $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.	22
Kuva 12. Universe-polymeraasin tulokset, 50 sykliä. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$ ja $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.	23
Kuva 13. Universe-polymeraasin tulokset, 60 sykliä. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$ ja $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.	24

## KUVIOT

Kuvio 1. RT-reaktioiden vaiheet ja olosuhteet.	18
--	----

## TAULUKOT

Taulukko 1. Polymeraasientsyymit.	14
Taulukko 2. Käänteistranskriptiosientsyymit.	14
Taulukko 3. Alukkeet.	15
Taulukko 4. Näytteet.	15
Taulukko 5. PCR-protokolla.	16
Taulukko 6. PCR-reaktiosekset.	1
Taulukko 7. RT-reaktiosekset.	2

# KÄYTETYT LYHENTEET

Lyhenne	Lyhenteen selitys
AGE	Agarose gel electrophoresis, agaroosigeelielektroforeesi
cDNA	complementary DNA, komplementaarinen DNA
CV-A9	Coxsackievirus A9
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
HPeV-1	Human parechovirus 1
IRES	Internal ribosome entry site, ribosomin kiinnittymiskohta
mRNA	Messenger RNA, lähetti-RNA
PCR	Polymerase Chain Reaction, polymeeraasiketjureaktio
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
RT	Reverse Transcriptase, käänteistranskriptaasi
RV-B14	Human rhinovirus B14
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
UTR	Untranslated region, ei-koodaava alue
VPg	Genome-linked viral protein

# 1 JOHDANTO

Virustutkimuksen kannalta on tärkeää, että tutkittavaa virusgenomia pystytään monistamaan mahdollisimman helpolla, nopealla ja kustannustehokkaalla tavalla. Pikornavirusgenomin suhteellisen pienestä koosta huolimatta, koko genomin monistaminen on edelleen haasteellista, sillä PCR-entsyymien tarkkuuksissa on vielä parannettavaa. Siksi tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää ja optimoida menetelmä, joka mahdollistaisi koko pikornavirusgenomin monistamisen käyttäen ns. pitkää RT-PCR-menetelmää. Tällaista PCR-tuotetta voidaan käyttää genomisekvensoinnissa, jonka avulla saadaan tietoja sekä epidemiologiasta että patogeneesistä, ja PCR-tuotteen kloonaus geenivektoriin mahdollistaa viruksen infektiokyvyn muutoksen tutkimisen kohdennetun geenimuokkauksen seurauksena.

Ihmisiä infektoivat pikornavirukset on yksi suurimmista virusryhmistä sisältäen melkein 300 virustyyppiä, jotka aiheuttavat laajan kirjon erilaisia oireita. Pikornavirusten yhteiskunnallisesta merkittävydestä huolimatta niille ei ole kehitetty antivirusräkkejä ja rokotteita on saatavilla vain polio- ja hepatiitti A-virukselle (Merilahti *et al.* 2012).

Työssä testattiin kuuden eri polymeraasientsyymin kykyä monistaa plasmidimuotoon kloonattua pikornavirusgenomia. Monistettua DNA:ta tarkasteltiin agarosigeelielektroforeesin avulla. Tehokkaimmin monistavia PCR-entsyymejä käytettiin PCR-protokollan optimoimiseen testaamalla syklimäärän ja nukleotidikonsentraation vaikutusta tuloksiin, mutta niiden osalta luotettavia tuloksia ei saatu ja testejä ei ehditty toistamaan.

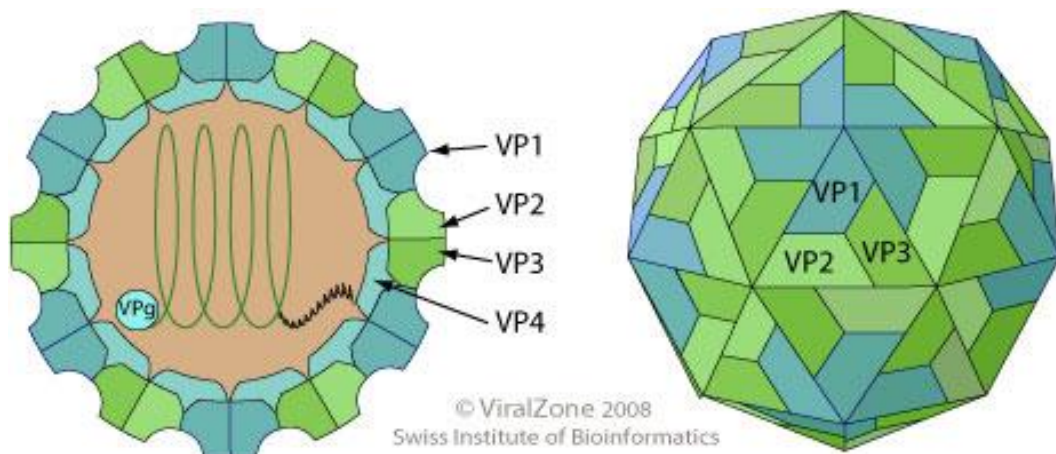
Opinnäytetyön aikana oli myös tarkoitus verrata eri valmistajien RT-entsyymejä ja valita niistä tehokkain, jonka jälkeen koko RT-PCR-prosessi olisi optimoitu. Aikarajoitteiden takia RT-entsyymien testaus jouduttiin keskeyttämään ja sen osalta tulokset ovat puutteelliset.



## 2 PIKORNAVIRUKSET

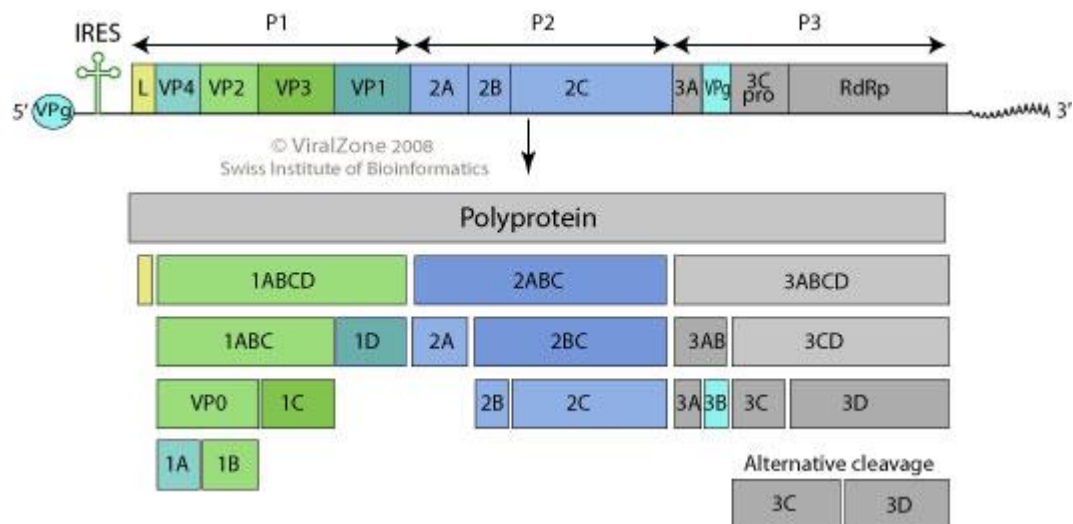
Pikornavirukset (*Picornaviridae*-heimo) ovat pyöreitä, hyvin pieniä (läpimitta noin 28 nm) ja vaipattomia RNA-viruksia, jotka jakautuvat 40 virussukuun ja joista 8 sukua infektoi ihmisiä (Picornaviridae.com 2018). Pikornavirukset kuuluvat yleisimpien virusperäisten taudinaiheuttajien joukkoon ja monet pikornaviruksista johtuvat infektiot aiheuttavat vain lieviä vatsa- ja ylähengitysteiden oireita (esim. rinoviruksen aiheuttama flunssa) tai ovat täysin oireettomia. Pikornavirusten aiheuttamiin seurauksiin kuuluu kuitenkin myös hyvin tunnettuja merkittävämpiä tauteja kuten polio, aseptinen aivokalvontulehdus ja eläimillä esiintyvä suu- ja sorkkatauti (Merilahti *et al.* 2012). Pikornavirukset välittyvät pääasiassa pisaratartunnalla tai suun kautta ulosteen välityksellä. Myös jotkin hyönteiset, kuten torakat ja kärpäset voivat toimia viruksen vektoreina. (Yin-Murphy & Almond 1996)

Pikornaviruksen RNA-genomia suojaa ikosahedraalinen proteiinikuori (Kuva 1) joka koostuu 3-4 kapsidiproteiinista. Jos viruksella on neljä kapsidiproteiinia (esim. entero- ja rinovirukset), kapsidiproteiinit VP1, VP2 ja VP3 muodostavat kuoren ulko-osan ja kapsidiproteiini VP4 sijaitsee kuoren sisäpinnalla. Jos viruksella on 3 kapsidiproteiinia (mm. parechovirukset), muodostuu kuori pelkästään VP0, VP1 ja VP3 kapsidiproteiineista. Virusten yksijuosteisen, positiivissäikeisen RNA-genomin pituus on 7100-8900 emäsparia ja se pystyy toimimaan mRNA:n tavoin proteiinisynteesissä. (ViralZone 2018)



Kuva 1. Pikornaviruksen rakenne. (ViralZone 2018)

Viruksen genomin P1-alue koodaa kapsidiproteiineja, kun taas P2- ja P3-alueet koodaavat replikaatioon liittyviä proteiineja (Kuva 2)(ViralZone 2018). VPg on kiinnittynyt genomin 5'-päähän ja 3'-päässä on poly(A)-häntä. VPg-proteiini toimii alukkeena RNA-synteesissä. 5'-pään ei-koodaava alue (UTR) on erityisen pitkä (n. 600-1200 nukleotidiä) ja sisältää useita replikaatiolle ja translaatiolle tärkeitä elementtejä, kuten ribosomin kiinnitysmiskohdan (IRES). (Tuthill *et al.* 2010)

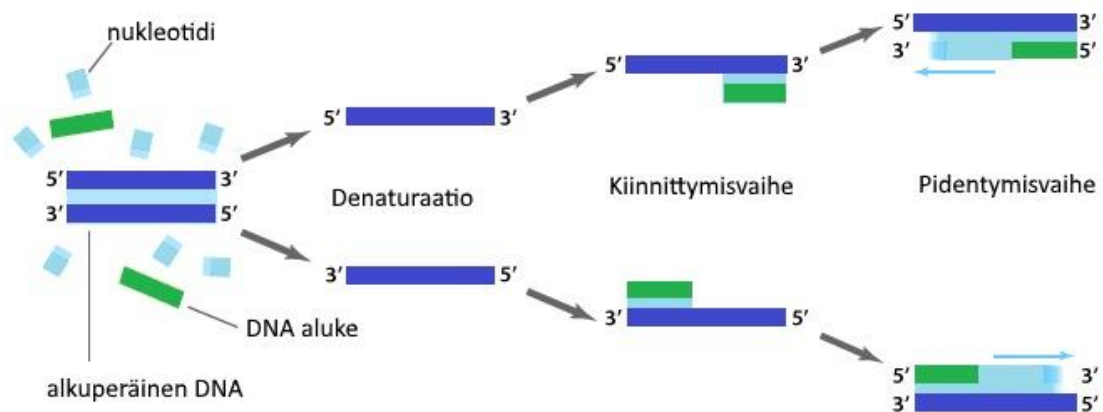


Kuva 2. Pikornaviruksen genomi. (ViralZone 2018)

## 3 TUTKIMUSMENETELMÄT

### 3.1 Pitkä-PCR

Polymeraasiketjureaktio eli PCR (Kuva 3) hyödyntää luonnollisia replikaatioprosesseja DNA:n kopiaimiseksi kolmessa vaiheessa, jotka ovat: DNA-nauhan denaturaatiovaihe, alukkeiden kiinnittymisvaihe ja DNA-ketjun pidentymisvaihe.



Kuva 3. Polymeraasiketjureaktio. (XXPress PCR 2018)

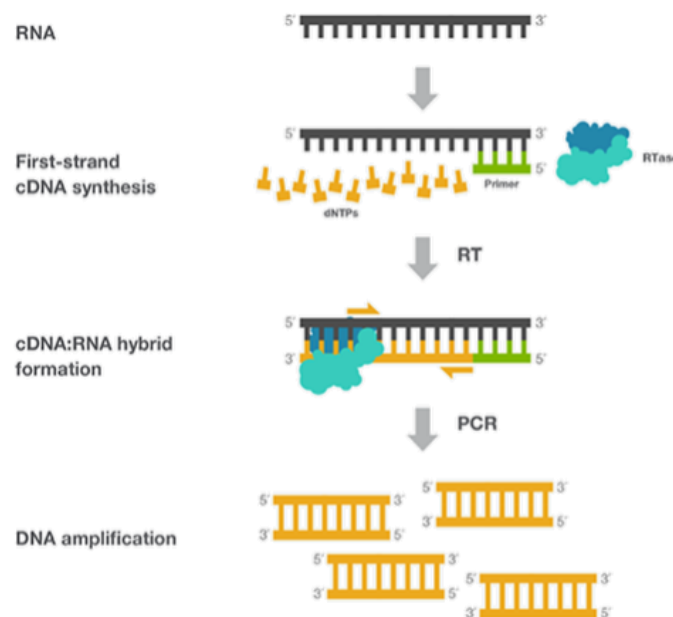
Denaturaation aikana lämpötila nostetaan hetkeksi 94-98 °C asteeseen, jotta templaatti-DNA denaturoituu eli DNA:n vastinjuosteet irtoavat toisistaan. Lämpötilaa lasketaan sitten 45-72 °C asteeseen, jolloin alukkeet kiinnittyvät yksijuosteiseen DNA:han. Pidentymisvaiheessa lämpötilaa taas nostetaan 72 °C asteeseen jolloin polymeraasi luo uuden vastinjuosteen alukkeista alkaen. PCR reaktio on erittäin herkkä ja sen toimivuus riippuu useista tekijöistä. Optimaalisen tuloksen tuottava menetelmä riippuu templaatti-DNA:sta, käytetystä polymeraasista, nukleotidikonsentraatiosta, puskuriliuoksesta, alukkeista, reaktiossa käytetyistä lämpötiloista ja lämpötilajakson kestosta sekä PCR reaktion syklimäärästä. (Hughes & Moody 2007)

Pitkä-PCR erottuu normaalista PCR reaktiosta siten, että templaatti-DNA on yleensä huomattavasti normaalia pidempi. Reaktiota suunniteltaessa pitää ottaa huomioon mm. polymeraasin nopeus, joka vaikuttaa pidentymisvaiheeseen. Pitkä templaatti-DNA vaatii myös paljon enemmän polymeraasin tarkkuudelta, jos tarkoituksena on monistaa alkuperäistä vastaava nukleotidinauha. Tämä on tärkeää esim. viruksen toimivuuden kannalta, jos PCR-tuotetta käytetään infektiivisen viruksen tuottamiseen.

PCR-reaktioiden suorittamiseen työn aikana käytettiin Veriti 96-Well Thermal Cycler – laitetta.

### 3.2 Käänteistranskriptio

Käänteistranskriptio eli RT-reaktio (reverse transcription) (Kuva 4) on prosessi, jolla RNA:sta voidaan syntetisoida komplementaarista DNA:ta (cDNA), joka on yksijuosteinen DNA-molekyyli ilman introneja. Käänteiskopioijaentsyymi (reverse transcriptase) tuottaa RNA-genomille komplementaarisen DNA:n, joista yhdessä muodostuu kaksijuosteinen cDNA-RNA-hybridi, joka soveltuu templaatti-DNA:ksi PCR reaktioon. (Farrell 2010)



Kuva 4. Käänteistranskriptio. (Thermo Fisher Scientific 2018)

### 3.3 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesi eli AGE on elektroforeesimenetelmä, jossa käytetään nimensä mukaisesti agarosigeeliä. Se soveltuu DNA- ja RNA-juosteiden tunnistamiseen, erottamiseen ja puhdistamiseen. Menetelmän toiminta perustuu sähkökentän

muodostamiseen, jolloin negatiivisesti varautuneet DNA/RNA -palaset kulkeutuvat geelin läpi kohti positiivista napaa ja palojen liikkumisnopeus riippuu niiden koosta. Nukleihin happo värjätään joko suoraan tai siihen sitoutuvaa väriainetta lisätään geeliin joko ennen ajoa tai sen jälkeen. Lopputuloksia voidaan tarkastella UV-valon avulla, koska väriaine fluoresoi UV:ssa. (Pärssinen *et al.* 2012)

## 4 REAGENSIT

### 4.1 Entsyymit

Tutkimuksessa käytettiin korkealaatuisia DNA-polymeraaseja kuudelta eri valmistajalta (Taulukko 1). Polymeraasien suositellut käyttöindikaatiot olivat riittävän samankaltaisia, minkä takia niitä voitiin käyttää rinnakkaisissa reaktioissa samalla PCR-ajo-ohjelmalla.

Taulukko 1. Polymeraasientsyymit.

Valmistaja	Entsyymin tuotenimi
Bioutil	Universe High-Fidelity Hot Start DNA Polymerase
Finnzymes	Phusion High-Fidelity DNA Polymerase
Invitrogen	Platinum SuperFi Green DNA Polymerase
KAPA Biosystems	KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase
New England BioLabs	Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase
Takara	PrimeSTAR GXL DNA Polymerase

Erilaisia käänteistranskriptiosyymejä oli tutkimuksessa mukana kolme (Taulukko 2). Huomattava ero tuotteiden välillä on se, että SuperScript III:n ja ImProm-II:n RT-reaktiot vaativat 45-80 minuuttia, mutta uudempi SuperScript IV:n reaktio vaatii vain 20 minuuttia.

Taulukko 2. Käänteistranskriptiosyymit.

Valmistaja	Entsyymin tuotenimi
Invitrogen	SuperScript III Reverse Transcriptase
Invitrogen	SuperScript IV Reverse Transcriptase
Promega	ImProm-II Reverse Transcriptase

#### 4.2 Alukkeet

Tutkimus aikana käytettiin kolmea eri virusta (coxsackievirus A9, ihmisen parechovirus 1 ja ihmisen rinovirus B14) joille kaikille oli omat Forward- ja Reverse-primerit eli alukkeet ja niiden sekvenssit on listattu taulukkoon 3.

Taulukko 3. Alukkeet.

Aluke	Sekvenssi
CV-A9 F	TAATACGACTCACTATAGGGTTTAAAACAGCCTGTGGGTTGTTCCC
CV-A9 R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCGCACCGAATGCGG
HPeV-1 F	TAATACGACTCACTATAGGGTTTGAAAGGGGTCTCCTAGAGAG
HPeV-1 R	TTTTTTTTTTTGTTCATGTCCAATGTTCC
RV-B14 F	TAATACGACTCACTATAGGGTTAAAACAGCGGATGGGTATCCCA
RV-B14 R	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATAAACTCCTACTTCTACTCAAATTA

#### 4.3 Näytteet

Näytteinä käytettiin kolmea plasmidimuodossa olevaa virusta, sekä yhtä virus-RNA:ta (Taulukko 4).

Taulukko 4. Näytteet.

Plasmidi	Virus-RNA	Tyyppi	Laji
pCV-A9	-	Coxsackievirus A9	<i>Enterovirus B</i>
pHPeV-1	HPeV-1	Human parechovirus 1	<i>Parechovirus A</i>
pRV-B14	-	Human rhinovirus B14	<i>Rhinovirus B</i>

## 5 TOTEUTUS

### 5.1 PCR-entsyymit

Ennen jokaista PCR-ajoa näytteiksi valituista plasmideista valmistettiin laimennossarja  $10^3$ - $10^8$  (kopioluku/ $\mu$ L). Alkuperäisten näytteiden kopioluvut ja pitoisuudet (ng/ $\mu$ L) olivat tiedossa, mutta opinnäytetyön aikana ne vielä tarkastettiin mikrotilavuus-spektrofotometrillä (DeNovix DS-11 Spectrophotometer).

Opinnäytetyön alussa keskityttiin testaamaan kaikkia kuutta DNA-polymeraasia, mutta vain yhden plasmidin (pRV-B14) kanssa. Useista yrityksistä huolimatta kyseisellä plasmidilla ei saatu monistettua PCR-tuotteita, vaikka tietojen mukaan se on aikaisemmissa tutkimuksissa toiminut. Koska syytä epäonnistumisille ei löydetty PCR-reagensseista, siirryttiin kokeilemaan kahden muun plasmidin (pCV-A9 ja pHPeV-1) toimivuutta. Testien perusteella huomattiin, että pHPeV-1 plasmidilla saadaan toistettavasti monistettua PCR-tuotteita, mistä johtuen kaikki tuloksia tuottaneet testit suoritettiin kyseisellä plasmidilla.

Kaikissa testeissä käytettiin samaa PCR-protokollaa (Taulukko 5) syklitestejä lukuun ottamatta.

Taulukko 5. PCR-protokolla.

Vaihe	Lämpötila	Aika	
Alkudenaturaatio	98 °C	30 s	
Denaturaatio	98 °C	15 s	x 40 sykliä
Alukkeiden kiinnittyminen	65 °C	30 s	
Pidennys	72 °C	3 min 30 s	
Loppupidennys	72 °C	7 min	
Jäähdytys	4 °C	$\infty$	

Reaktioseokset (Liite 1, Taulukko 6) valmistettiin reaktiosarjojen mukana tulleiden ohjeiden mukaan. Kiteissä tuli mukana myös dimetyylisulfoksidia (DMSO), mutta tutkimuksessa käytettyjen näytteiden guaniini-sytosiini-pitoisuus ei edellyttänyt sen käyttöä, joten se jätettiin pois reaktioseoksista.



Koska reaktioissa käytettiin templaatti-DNA:n laimennossarjoja oli polymeraasien toimivuutta helppo vertailla ajamalla eri laimennoksista saadut PCR-tuotteet rinnakkain agarosigeelielektroforeesilla.

#### 5.1.1 Syklimäärä

Syklimäärään vaikutusta PCR-tuotteiden määrään tutkittiin valitsemalla kolme polymeraasia (BioLabs Q5, Takara PrimeSTAR ja Biotool Universe), jotka olivat aikaisemmissa testeissä suoriutuneet hyvin. Testeissä käytettiin normaalia PCR-protokollaa (Taulukko 5) ja reaktioseoksia (Liite 1, Taulukko 6), mutta syklimäärää kasvatettiin. Yksi ajo suoritettiin 50 syklillä ja toinen 60 syklillä.

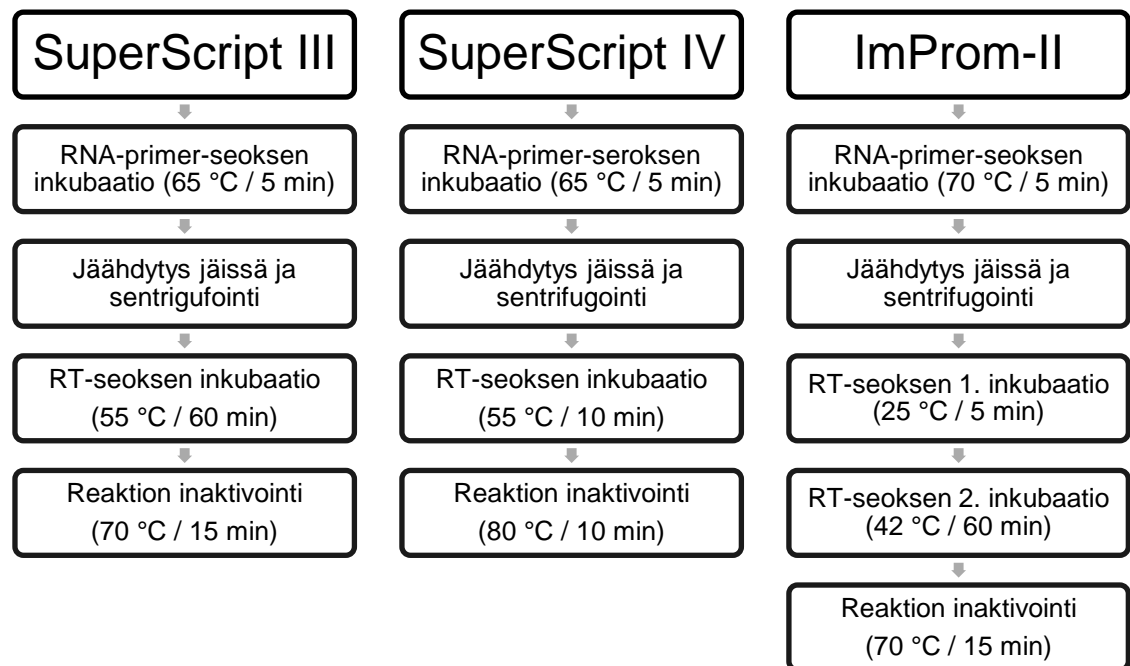
#### 5.1.2 Nukleotidikonsentraatio

Nukleotidikonsentraation vaikutusta reaktioihin tutkittiin valitsemalla vain kaksi parhaiten suoriutunutta polymeraasia (Biotool Universe ja BioLabs Q5) näytemäärän kontrolloimiseksi. Reaktioissa käytettiin normaalia PCR-protokollaa (Taulukko 5) ja reaktioseoksia (Liite 1, Taulukko 6), mutta jokaisessa reaktiossa käytettiin eri nukleotidikonsentraatiota. Templaatti-DNA:sta tehtiin vain kaksi laimennosta ( $10^5$  ja  $10^4$ ) normaalin laimennossarjan ( $10^3$ - $10^8$ ) sijaan. Reaktioita ajettiin neljällä nukleotidikonsentraatiolla: 20  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M ja 500  $\mu$ M.

#### 5.2 RT-entsyymit

RT-entsyymien testit jouduttiin keskeyttämään aikarajoitteiden takia, joten reaktioita ehdittiin ajaa vain yhden kerran. Testeihin oli valittu kolme eri käänteistranskriptaasia: Invitrogenin SuperScript III ja SuperScript IV sekä Promegan ImProm-II. Entsyymien reaktioseokset (Liite 1, Taulukko 7) ja reaktio-olosuhteet ovat osittain erilaiset, joten testien yhtäaikaisten suorittaminen oli jokseenkin hankalaa.

SuperScript III ja IV –reaktioissa valmistettiin RNA-primer-seos veden, dNTP seoksen, virus-RNA:n sekä 3'-primerin kanssa, kun taas ImProm-II –reaktioissa siihen käytettiin vain virus-RNA:ta sekä 3'-primeria. RT-seos valmistettiin lopuista reagensseista ja se yhdistettiin RNA-primer-seoksen kanssa ensimmäisen inkubaatiovaiheen jälkeen.



Kuvio 1. RT-reaktioiden vaiheet ja olosuhteet.

Reaktio-olosuhteet ovat kaikilla kolmella entsyymillä erilaiset ja ne on selitetty tarkemmin kuviossa 1.

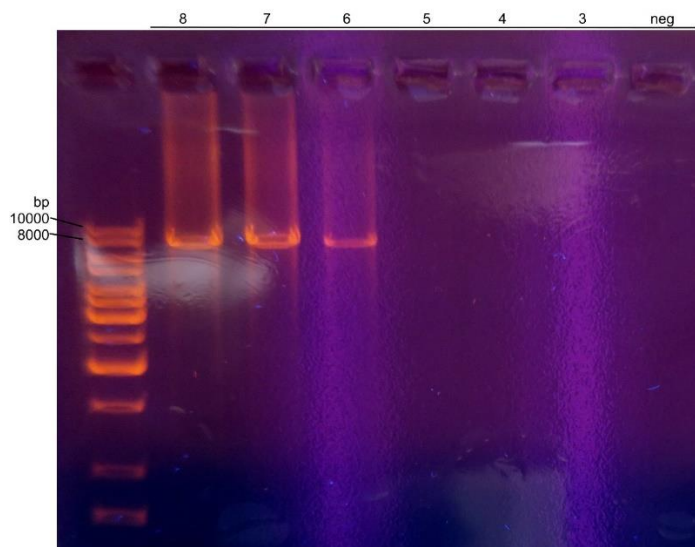
## 6 TULOKSET

### 6.1 PCR-entsyymit

PCR-reaktioiden analysointi suoritettiin agarosigeelielektroforeesilla. Käytettyjen gee-  
lien agarosikonsentraatio oli 0,8% ja niitä ajettiin 100 V jännitteellä 60 minuuttia. Väri-  
aineena käytettiin etidiumbromidia (EtBr) joka lisättiin valmistusvaiheessa suoraan gee-  
liin. Geeleille pipetoitiin 5  $\mu$ L näytettä ja 1  $\mu$ L puskuria per kaivo. Käytetty kokomarkkeri  
oli Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder.

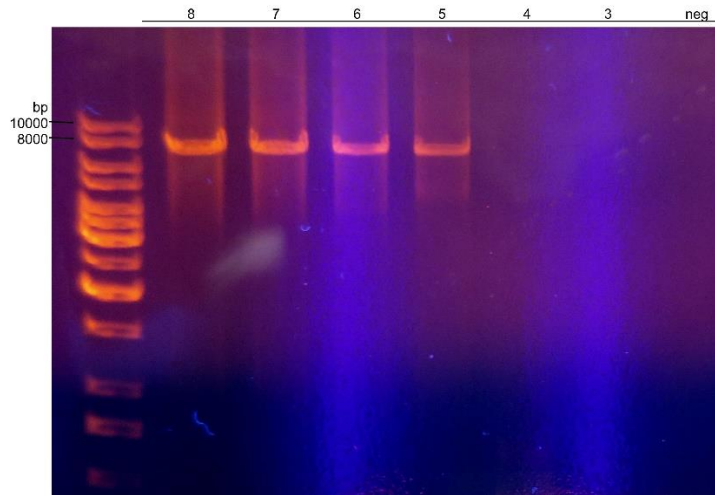
Geelillä näkyvien RV-B14-bändien kirkkaudesta ja paksuudesta voitiin päätellä PCR-  
tuotteen määrä, jonka perusteella DNA-polymeraasien suorituskykyä arvioitiin. Tutki-  
tuista DNA-polymeraaseista vain yhden osalta ei saatu tuloksia (Invitrogen Platinum).

KAPA-polymeraasin herkkyys riitti ainoastaan  $10^6$ -laimennokseen saakka (Kuva 5).



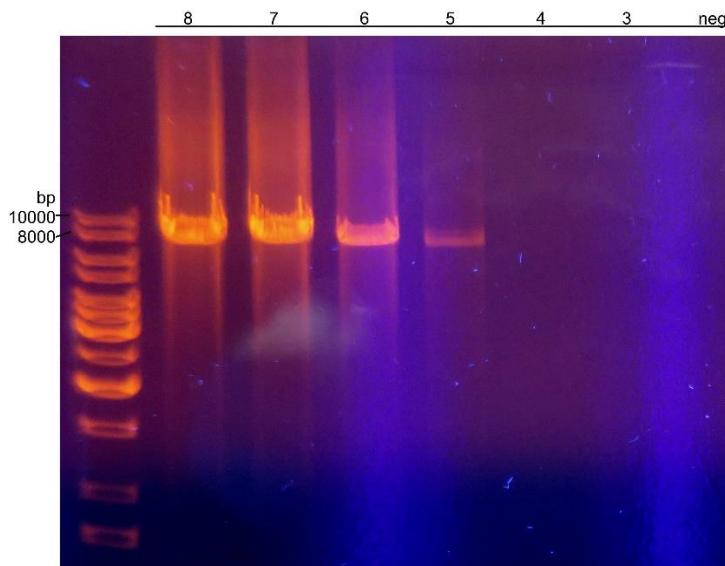
Kuva 5. KAPA-polymeraasin tulokset. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien ko-  
piolukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$  ja  $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-  
DNA:ta.

Finnzymesin Phusion osoittautui hieman tehokkaammaksi ja testissä saatiin PCR-tuot-  
teita myös  $10^5$ -laimennoksella (Kuva 6). Mielenkiintoista on kuitenkin se, että templaatti-  
DNA:n määrä reaktiossa ei näytä vaikuttavan bändin paksuuteen merkittävällä tavalla.



Kuva 6. Phusion-polymeraasin tulokset. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$  ja  $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.

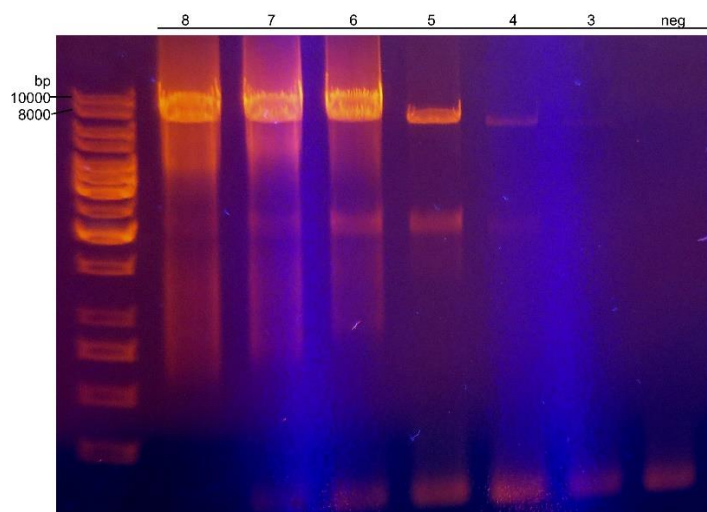
PrimeSTAR-polymeraasilla saatiin PCR-tuotteita  $10^5$ -laimennoksella, mutta sen bändi on hieman haalea eli tuotteiden määrä on pienempi verrattuna toisiin polymeraaseihin. (Kuva 7).



Kuva 7. PrimeSTAR-polymeraasin tulokset. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$  ja  $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.

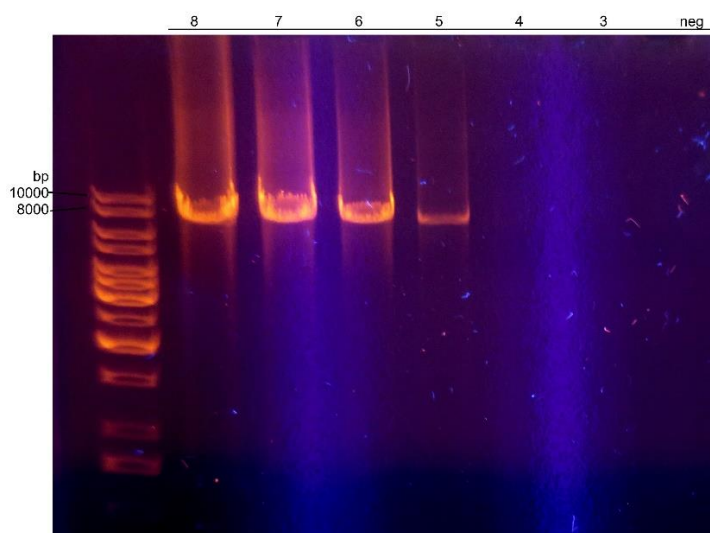
Herkimmäksi osoittautuneella Biotoolin Universe-entsyymillä havaittiin PCR-tuotteita selkeästi  $10^4$ -laimennoksella ja nähtävästi myös jopa  $10^3$ -laimennoksella, vaikka bändi

onkin erittäin haalea (Kuva 8). Toisin kuin muut polymeraasit, Universe vaikuttaa kuitenkin tuottavan myös paljon väärän kokoisia palasia (esim. geelin pohjalla näkyvät primer-dimerit).



Kuva 8. Universe-polymeraasin tulokset. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokuvien eksponentteja ( $8 = 10^8$  ja  $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.

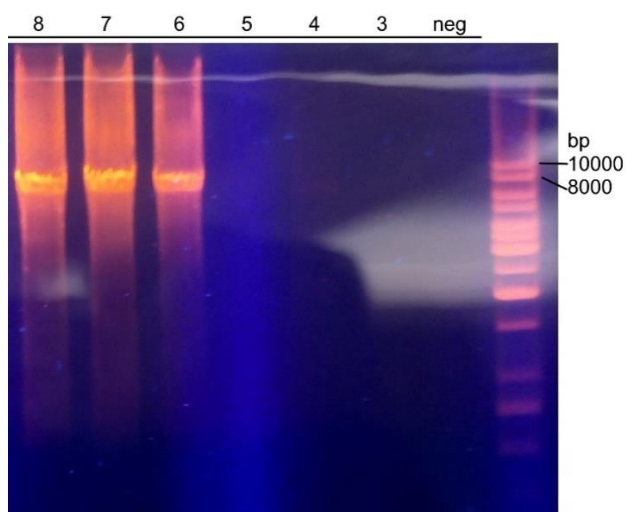
Myös viimeisenä testatulla Q5-polymeraasilla saatiin PCR- tuotteita  $10^5$ -laimennoksella (Kuva 9).



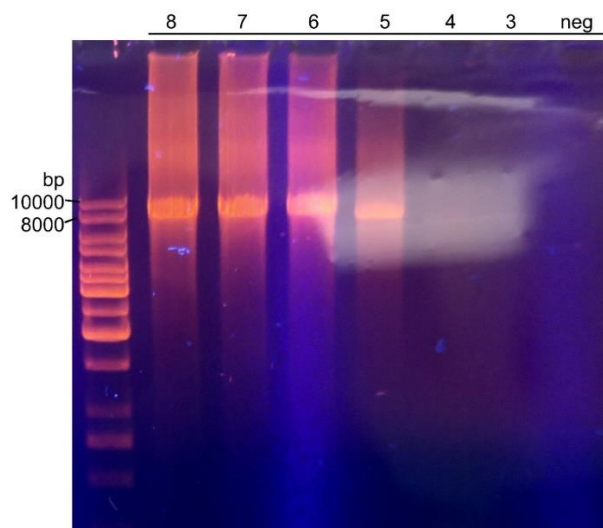
Kuva 9. Q5-polymeraasin tulokset. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokuvien eksponentteja ( $8 = 10^8$  ja  $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.

### 6.1.1 Syklimäärä

Syklimäärätestien suorituksessa oli ongelmia ja siten tuloksia ei voida pitää kovin luotettavina. Testeissä oli mukana PrimeSTAR-, Q5- ja Universe-polymeraasit, mutta useassa tapauksessa tulokset eivät olleet loogisia kuten kuvista 10 ja 11 näkyy. Q5-polymeraasin kohdalla tuloksia ei saatu lainkaan. Aikarajoitteiden takia testejä ei ollut mahdollista uusia.



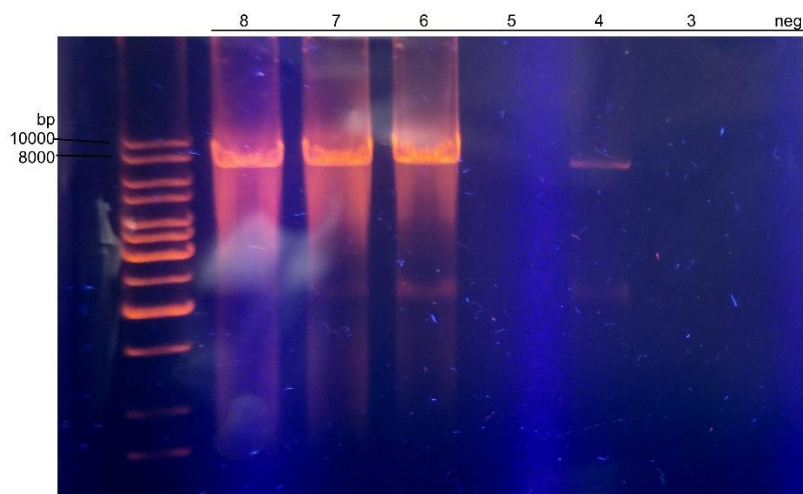
Kuva 10. PrimeSTAR-polymeraasin tulokset, 50 sykliä. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokertojen eksponentteja ( $8 = 10^8$  ja  $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.



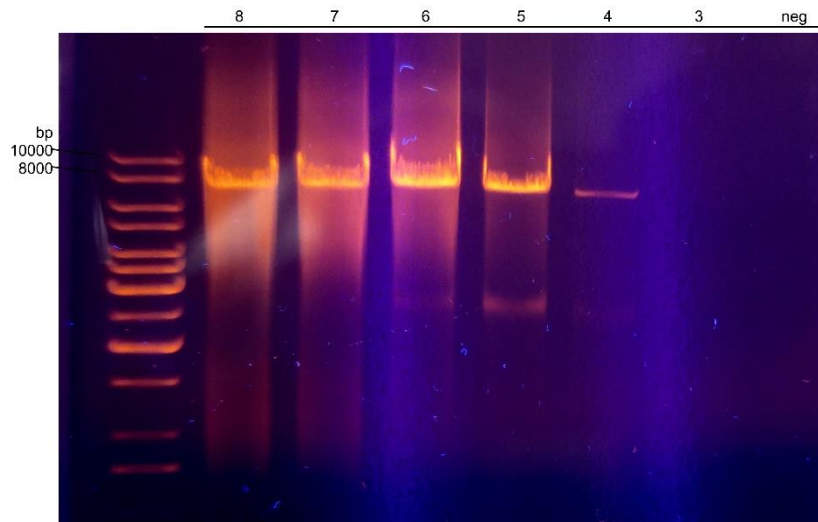
Kuva 11. PrimeSTAR-polymeraasin tulokset, 60 sykliä. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiokertojen eksponentteja ( $8 = 10^8$  ja  $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.

Kuvista nähdään, että PrimeSTAR-polymeraasi ei tuottanut PCR-tuotteita  $10^5$ -laimennoksella 50-syklin testissä, mutta toimi normaalisti 60-syklin testissä (sekä aikaisemmassa 40-syklin testissä). Todennäköisin syy on pipetointivirhe  $10^5$ -laimennoksen teossa, mutta koska syklitestejä ei ehditty toistaa ei pipetointivirheiden mahdollisuutta myös esim.  $10^4$ -laimennoksessa voida poissulkea. Tämän vuoksi on mahdotonta todeta, auttoiko syklimäärän nostaminen vai ei.

Aikaisemmissa testeissä parhaiten suoriutunut Universe-polymeraasi toimi hyvin myös syklitesteissä (Kuvat 12 ja 13). Näissäkin tuloksissa on kuitenkin yksi epäjohtonmukaisuus, jonka todennäköisin syy on pipetointivirhe.



Kuva 12. Universe-polymeraasin tulokset, 50 sykliä. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiolukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$  ja  $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta.



Kuva 13. Universe-polymeraasin tulokset, 60 sykliä. Kaivojen numerot vastaavat laimennoksien kopiolukujen eksponentteja ( $8 = 10^8$  ja  $3 = 10^3$ ) ja neg on kaivo, johon ei tullut templaatti-DNA:ta

Jos kuitenkin oletetaan, että 50-syklin testin  $10^5$ -laimennoksen kaivon kohdalla on kyseessä pipetointivirhe ja ongelma ei ole vaikuttanut muihin tuloksiin, voidaan päätellä, että PCR-tuotteiden määrän kasvaa syklimäärän mukana, mutta polymeraasin herkkyys on mahdollista todeta jo 40-syklin kohdalla. Eli jos PCR-tuotteita ei saada monistettua 40-syklillä niin sama pitää paikkansa myös 60-syklillä.

#### 6.1.2 Nukleotidikonsentraatio

Nukleotidikonsentraatiotesti epäonnistui ja niistä ei saatu tuloksia analysoitavaksi. Aikarajoitteiden takia testiä ei ollut mahdollista uusida.

#### 6.2 RT-entsyymit

Käänteistranskriptaasien testaus jouduttiin keskeyttämään ja ensimmäisestä testistä ei saatu tuloksia. Aikarajoitteiden takia testejä ei ollut mahdollista jatkaa.



## 7 JOHTOPÄÄTÖKSET

### 7.1 Pohdintaa

Opinnäytetyön lopullisena tavoitteena oli luoda optimoitu pitkä RT-PCR-menetelmä, jolla olisi mahdollista monistaa pikornaviruksia. Toimivan menetelmän kehittäminen helpottaisi jatkotutkimuksien tekemistä huomattavasti ja on siten tärkeä etappi pikornavirustutkimuksen osalta. Työn aikana saatiin kerättyä arvokasta dataa tutkimukseen valittujen DNA-polymeraasien toimivuudesta. Tutkimusten aikana todennettiin myös valitun PCR-ajo-ohjelman toimivuus.

Tuloksien perusteella on helppo sanoa, että Universe-polymeraasi vaikuttaisi parhaalta vaihtoehdolta, sillä se pystyy tuottamaan PCR-tuotteita hyvinkin pienestä määrästä DNA-templaattia ja siten soveltuu parhaiten käytettäväksi kliinisten näytteiden kanssa, jossa kopioluvut ovat yleensä pieniä. Yksi tärkeä huomioon otettava tekijä on kuitenkin polymeraasin tarkkuus, joka yleensä ilmoitetaan suhteutettuna *Taq*-polymeraasiin. Q5-polymeraasi on tässä kategoriassa ehdottomasti paras (valmistajan mukaan noin 280 kertaa tarkempi kuin *Taq*) kun taas Universe-polymeraasin tarkkuudeksi mainitaan vain 53 kertaa *Taq*-polymeraasi. Tutkimuksia varten halutaan kuitenkin usein infektiivisiä klooneja, johon virheiden määrä saattaa vaikuttaa, joten Q5-polymeraasi on turvallisin vaihtoehto testatuista polymeraaseista ja se myös osoittaa riittävää herkkyttä.

### 7.2 Jatkotutkimukset

Seuraava vaihe tutkimuksessa olisi uusia epäonnistuneet nukleotidikonsentraatio- ja syklimärrätestit sekä suorittaa tekemättä jääneet suunnitellut testit. PCR-vaiheen optimointia varten nukleotidikonsentraation vaikutus reaktioon pitää testata uudelleen ja vaikka syklistesteistä saatiin osittaisia tuloksia, ne olisi myös hyvä toistaa. RT-vaiheen osalta pitäisi selvittää paras tarjolla olevista RT-entsyymeistä ja validoida koko RT-PCR-menetelmän toimivuus alusta loppuun.

Kun RT-PCR-menetelmä on optimoitu, voidaan lähteä testaamaan sitä myös entero- ja rinovirustyypeillä sekä kliinisillä näytteillä. Q5-polymeraasi osoitti toimivansa  $10^5$ -kopioluvulla, mutta koska RT-vaihe heikentää testin herkkyttä on vaatimus virusnäytteen kopiолuvulle luultavasti suurempi, kun lähtömateriaalina on virus-RNA. Kliinisten näytteiden

osalta pitää myös ottaa huomioon mahdolliset PCR-reaktiota inhiboivat aineet (esim. verinäytteissä) jolloin viruksen puhdistaminen ennen RT-PCR-prosessia on tärkeää.

## LÄHTEET

Farrell, R.E. 2010, *Chapter 17 - cDNA Synthesis*, San Diego: Academic Press.

Hughes, S. & Moody, A. 2007, *PCR*, Scion, Bloxham.

Merilahti, P., Koskinen, S., Heikkilä, O., Karelehto, E. & Susi, P. 2012, "Endocytosis of integrin-binding human picornaviruses", *Advances in virology*, vol. 2012, pp. 547530.

Picornaviridae.com. 2018. The home of Picornaviruses. Viitattu 2.6.2018 <http://www.picornaviridae.com/>.

Pärssinen, R., Suominen, I. & Haapanen, K. 2012, *Biogeeni : ammatillista biokemiaa ja geenitekniikkaa*, Opetushallitus, Helsinki.

Thermo Fisher Scientific. 2018. Reverse Transcription—Six Most Common Applications. Viitattu 3.6.2018 <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-applications.html>.

Tuthill, T.J., Groppe, E., Hogle, J.M. & Rowlands, D.J. 2010, "Picornaviruses", *Current topics in microbiology and immunology*, vol. 343, pp. 43-89.

ViralZone. 2018. ViralZone. Viitattu 2.6.2018 <https://viralzone.expasy.org/33>.

XXPress PCR. 2018. XXPress PCR. Viitattu 2.6.2018 <https://www.xpresspcr.com/all-news/polymerase-chain-reaction-the-past-present-and-future/>.

Yin-Murphy, M. & Almond, J.W. 1996, "Picornaviruses" in *Medical Microbiology*, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).

## Pipetointikaaviot

Taulukko 6. PCR-reaktioseokset.

KAPA		Finnzymes Phusion	
Reagenssi	Määrä (µL)	Reagenssi	Määrä (µL)
ddH <sub>2</sub> O	15,5	ddH <sub>2</sub> O	32,5
Puskuriliuos	5	Puskuriliuos	10
dNTP seos (10 mM)	0,5	dNTP seos (10 mM)	1
5'-aluke (10 µM)	1,25	5'-aluke (10 µM)	2,5
3'-aluke (10 µM)	1,25	3'-aluke (10 µM)	2,5
Templaatti-DNA	1	Templaatti-DNA	1
Polymeraasi	0,5	Polymeraasi	0,5
	25		50

Takara PrimeSTAR		Biotool Universe	
Reagenssi	Määrä (µL)	Reagenssi	Määrä (µL)
ddH <sub>2</sub> O	28	ddH <sub>2</sub> O	8
Puskuriliuos	10	Puskuriliuos	12,5
dNTP seos (10 mM)	4	dNTP seos (10 mM)	0,5
5'-aluke (10 µM)	2,5	5'-aluke (10 µM)	1,25
3'-aluke (10 µM)	2,5	3'-aluke (10 µM)	1,25
Templaatti-DNA	1	Templaatti-DNA	1
Polymeraasi	2	Polymeraasi	0,5
	50		25

(jatkuu)

Taulukko 6 (jatkuu).

Invitrogen Platinum		BioLabs Q5	
Reagenssi	Määrä (µL)	Reagenssi	Määrä (µL)
ddH <sub>2</sub> O	32,5	ddH <sub>2</sub> O	32,5
Puskuriliuos	10	Puskuriliuos	10
dNTP seos (10 mM)	1	dNTP seos (10 mM)	1
5'-aluke (10 µM)	2,5	5'-aluke (10 µM)	2,5
3'-aluke (10 µM)	2,5	3'-aluke (10 µM)	2,5
Templaatti-DNA	1	Templaatti-DNA	1
Polymeraasi	0,5	Polymeraasi	0,5
	50		50

Taulukko 7. RT-reaktioseokset.

Invitrogen SuperScript III		Invitrogen SuperScript IV	
Reagenssi	Määrä (µL)	Reagenssi	Määrä (µL)
Virus-RNA	4	Virus-RNA	4
3'-aluke (10 µM)	1	3'-aluke (10 µM)	1
dNTP seos (10 mM)	1	dNTP seos (10 mM)	1
RNA-vapaa H <sub>2</sub> O	7	RNA-vapaa H <sub>2</sub> O	7
Puskuriliuos	4	Puskuriliuos	4
DTT (0,1 M)	1	DTT (0,1 M)	1
RNaseOUT	1	RNaseOUT	1
RT-entsyymi	1	RT-entsyymi	1
	20		20

(jatkuu)

Taulukko 7 (jatkuu).

<b>Promega ImProm-II</b>	
Reagenssi	Määrä (µL)
Virus-RNA	4
3'-aluke (10 µM)	1
dNTP seos (10 mM)	1
RNA-vapaa H <sub>2</sub> O	7
Puskuriliuos	4
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1
RNaseOUT	1
RT-entsyymi	1
	20